

審査の結果の要旨

氏名 入山 彩

本研究は加齢黄斑変成(AMD)に伴う脈絡膜新生血管(CNV)の発生riskの増加に関与していると報告されているリポフスチンの構成成分の一つであるA2Eのin vitro、in vivoにおけるレチノイン酸受容体(RAR)への作用の解明、またCNV発生における作用の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. A2Eの核内受容体に対する作用検討

Hec293T細胞を用いルシフェラーゼアッセイを用い各種核内受容体および転写因子の活性化に対するA2Eの影響を検討した。その結果、A2EがRARの転写活性を濃度依存性に活性化することを明らかにした。また、in vitroの結合実験で、A2EがRARに直接結合する事を確認した。さらに、ヒト網膜色素上皮(RPE)細胞株のARPE19細胞を用いA2Eを負荷しRARの標的遺伝子の発現をRT-PCR法を用い検討した結果、A2EがmRNAレベルでNORPEG, SCDの発現の増強作用を有する事が明らかになった。また、RARのリガンドであるatRAを負荷した場合24時間、48時間後ではこれらの遺伝子の発現が上昇するが、72時間後以降ではこの発現の上昇が認められなくなる一方、A2E負荷下では96時間後でもこれらの遺伝子の発現上昇が認められた。更にChromatin immunoprecipitation (ChIP) assayを行い、A2E, atRA共に負荷する事で、SCDのプロモーター領域のヒストンH4のアセチル化が認められ、96時間後にatRA負荷では低下するが、A2E負荷では持続する事を明らかにした。また、HPLCを用い、ARPE19細胞にatRAを負荷した際に72時間後では検出できなくなる一方、A2E負荷では72時間後でも細胞内に蓄積している事を明らかにした。

2. A2Eによる血管新生因子の発現制御

ヒトRPE細胞株のARPE19細胞を用いA2Eを負荷し血管新生因子の発現をELISA, RT-PCR法を用い検討した結果、A2EがmRNA及び蛋白レベルでVEGFの発現の増強作用を有することを明らかとした。更にRARaのアンタゴニストやRARaをターゲットとしたsiRNAによりこのVEGFの発現の上昇は緩和された。このことによりA2EはARPE19細胞においてRARaを介しVEGFの発現を上昇させている事が明らかになった。

3. 動物モデルでのA2Eの新生血管(CNV)への関与メカニズムの解明

In vivoではBrown Norwayラット網膜下にA2Eを注入しchoroid/RPE伸展標本を作成したところ、RPEの形は不整となり、個数の減少を認めた。また分化したRPE細胞のマーカーであるRPE65の発現がA2E網膜下注入眼では低下していた。これらの結果より

A2E が RPE 細胞に対して細胞毒性を有する事が明らかになった。さらに、A2E 網膜下注入眼において RT-PCR 法で VEGF の RPE と脈絡膜での発現の増加を認め、弱凝固を用いたレーザー誘発性 CNV を作成し、A2E 投与眼では CNV が増強されることを確認した。この作用はレチノイン酸受容体のアンタゴニストの投与で抑制されることが明らかになった。

以上本論文をまとめると A2E が蓄積する事により RPE 細胞内で RAR の転写活性が構成的に上昇し、また VEGF といった血管新生促進因子の発現上昇が持続する事が明らかになった。また A2E が蓄積する事により RPE の表現型が変化し慢性的に血管新生を促進する状態となり CNV の形成が促されると考えられた。

本研究はこれまで未知に等しかった、A2E の CNV 発生に関与する機序を解明し、AMD の病態解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。